

# 그레이브스병에서 조절 T 세포에 의한 병원성 자가항원반응성 CD4<sup>+</sup> T 세포의 억제효과

울산의대 울산대학교병원 내과학교실, 울산대학교병원 생의과학연구소<sup>1</sup>

김은숙 · 정효원<sup>1</sup> · 최정일<sup>1</sup> · 남궁일성 · 홍순형 · 김영일

## Suppression of Pathogenic Autoreactive CD4<sup>+</sup> T Cells by CD137-mediated Expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Graves' Disease

Kim Eun Sook, Jung Hyo Won<sup>1</sup>, Jung Il Choi<sup>1</sup>, Il Seung Nam-Goong, Soon Hyung Hong, Young IL Kim

*Department of Internal Medicine, Biomedical Research Center<sup>1</sup>, Ulsan University Hospital, Ulsan University of Collage of Medicine*

### ABSTRACT

**Background:** Graves' disease (GD) is an organ-specific autoimmune disease that is characterized by lymphocyte infiltration of the thyroid, which finally leads to follicular destruction. The CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are important for maintaining peripheral tolerance to self-antigens and impaired activity can cause autoimmune diseases. CD137 (4-1BB), a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and expressed on activated T cells, is a candidate molecule for a co-stimulatory role in autoimmune thyroid disease. In this study, we aimed to assay the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in GD patients and to investigate the role of CD137-mediated costimulation in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells.

**Methods:** The frequencies of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in the peripheral blood (PB) of GD patients were determined by flow cytometric analysis. After the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were isolated from PB mononuclear cells (PBMC) of the GD patients using immunomagnetic beads, the functional activity of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells was characterized by use of a proliferation assay. mRNA expression of Foxp 3 in the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells of the GD patients was observed by real-time RT-PCR.

**Results:** In this study, we found that GD patients had a low proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells (mean ± SD; 1.47 ± 0.31%) in PBMC as compared with normal subjects. CD137-mediated costimulation increased the expression of CD25 and Foxp 3 in CD4<sup>+</sup> T cells in GD patients as compared with normal subjects. Moreover, the CD137-mediated costimulation also induced the proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in GD patients, and the expanded CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells could suppress other CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells in a co-culture.

**Conclusion:** These results suggest that the peripheral expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells by CD137-mediated co-stimulation can suppress effector T cells and may be a potent therapy for Graves' disease. (J Kor Endocrine Soc 22:332~338, 2007)

**Key Words:** CD137-mediated costimulation, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells, Foxp 3, Graves' disease, Peripheral blood mononuclear cells

접수일자: 2007년 1월 22일

통과일자: 2007년 7월 22일

책임저자: 김영일, 울산의대 울산대학교병원 내과

\* 이 연구는 2005년 대한내분비학회 연구비지원의 지원을 받았음.

## 서 론

정상적인 면역반응의 항상성은 자가항원에 반응하는 자가 반응성 T 세포를 제거함으로써 이루어지는데, 이러한 조절기전이 실패할 경우 자가면역질환이 발병하게 된다[1,2]. 그레이브스병(Grave's disease, GD)은 갑상선 여포세포막의 갑상선 자극호르몬 수용체에 대한 자가항체가 생겨 갑상선자극호르몬과 같은 양상으로 수용체 결합 후 갑상선을 자극하여 갑상선 여포 세포의 증식과 갑상선호르몬의 과잉생산을 일으키는, 자가항원에 대한 항상성 조절기전 실패에 의한 갑상선 특이 자가면역질환이라 할 수 있다[3].

공동자극분자들에 의한 신호전달은 세포분열, 세포생존 및 사이토카인 분비와 같은 세포의 실질적인 기능을 유발시키는 데 매우 중요한 역할을 하며, 만약 이 경로가 차단될 경우 T 세포는 무반응(anergy) 상태에 빠지거나 제거과정에 접어들어 곧 사멸됨으로써 정상적인 면역반응을 유발하지 못하게 된다[4~7]. CD137(4-1BB)은 중앙괴사인자 수용체 계열의 유도성 공동자극분자로서 collagen-induced arthritis, 실험성 자가면역성 뇌척수염과 같은 자가면역질환 동물실험을 통해 항진성 단클론항체(agonistic monoclonal antibody, anti-4-1BB) 투여가 병원성 자가반응성 CD4<sup>+</sup> T 세포(pathogenic autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells)의 기능을 억제시킴으로써 자가면역질환을 치료할 수 있음이 밝혀져 이를 통한 신호전달조절을 이용하는 새로운 면역치료방법이 최근 연구되고 있는 추세이다[6~10].

조절 T 세포(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell)는 정상적인 말초혈 내 존재하는 특정 세포집단으로서 자가 항상성 유지에 매우 중요한 역할을 하는데, 자가면역질환의 주요 병인이 되는 병원성 자가 반응성 T 세포의 활성 및 증식을 억제함으로써 자가면역반응을 조절하는 것으로 알려지면서 최근 자가면역질환 치료에의 적용가능성에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다[11,12]. 최근 갑상선 질환과 관련하여 실험성 자가면역성 갑상선염 동물 모델 실험에서 공동자극분자인 당질코르티코이드 유도성 중앙괴사인자 수용체 항체를 통한 신호전달 조절이 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에 의해 thyroiditogenic T 세포 활성을 억제함으로써 실험성 자가면역성 뇌척수염 관용이 억제될 수 있다는 보고가 있다[13]. 저자는 이전 연구를 통해 그레이브스병 환자의 말초혈액 내 CD4<sup>+</sup> T 세포에서 정

상군에 비해 높은 CD137 발현특성을 나타내며, 특히 CD137의 soluble form의 생성이 질병 정도와 밀접하게 연관되는 것을 확인하여 이미 보고한 바 있다[6].

따라서 본 연구에서는 그레이브스병 환자의 말초혈액으로부터 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포를 분리하고 조절 T 세포에서의 CD137의 발현특성 및 CD137 항체를 통한 공동자극이 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포 증식을 유도함으로써 병원성 자가항원 반응성 CD4<sup>+</sup> T 세포의 활성을 억제할 수 있는지 조사하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

2004년 4월부터 12월까지 병원에 내원하여 처음으로 그레이브스병 진단을 받은 환자 20명을 대상으로 말초혈액을 수집하였으며, 실험군에 대한 대조군으로 건강한 정상인 20명의 말초혈액을 이용하였다. 그레이브스병의 진단은 갑상선중독증의 증상과 갑상선 호르몬검사, 갑상선자극호르몬 수용체 항체(TBII), 갑상선글로블린과 갑상선과산화효소에 대한 자가항체 검사 그리고 갑상선 스캔검사 등을 통하여 진단하였고, 내원당시 항갑상선제를 복용하고 있거나 재발된 경우는 제외하였다(Table 1). 그레이브스병 환자와 정상인의 말초혈액은 본원 윤리위원회 규정에 따라 환자 동의 후 heparinized (10 U/mL) vacutainer (BD PharMingen, CA)에 수집하였다.

### 2. 세포 분리

수집된 각 실험군과 대조군의 말초혈액으로부터 Ficoll Hypaque 용액을 이용한 밀도구배 원심분리법에 의해 단핵세포를 분리하였다. 분리된 단핵세포를 1 × phosphate buffered saline (PBS)로 2번 세척한 다음 CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)를 이용하여 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포 및 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포를 분리하였으며, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 순도를 유세포 분석으로 조사한 결과 89.6%였다. 또한 분리된 단핵세포를 100 mm 배양용기에서 3시간 배양하여 상층액을 제거한 후 바닥에 붙어 있는 단핵세포만을 수거하여 항원제시세포(antigen presenting cell, APC)로 사용하였다.

**Table 1.** Clinical characteristics of GD patients and normal subjects

	n	Age (year)		Gender		TBII (%)	Free T4 (ng/dL)	TSH (μU/mL)	TPOAb (IU/mL)	TgAb (IU/mL)
		F	M	F	M	0~15.0	0.89~1.81	0.35~5.50	0~25	0~40
Reference value										
Graves' disease	20	36 ± 11	16	4	40.9 ± 17.3 <sup>†</sup>	6.43 ± 2.39 <sup>†</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>†</sup>	466 ± 358 <sup>†</sup>	304 ± 683	
Control	20	42 ± 8	20	0	3.8 ± 2.1	1.4 ± 1.06	0.58 ± 0.68	12 ± 11.3	2.6 ± 3.4	

TBII, thyroid binding inhibitory immunoglobulin; TPOAb, antibodies to thyroid peroxidase; and TgAb, antibodies to thyroglobulin.

<sup>†</sup> P < 0.001 for the comparison with normal control.

### 3. 유세포 분석

실험군과 대조군의 단핵세포에서의 CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 세포 분포 및 CD137의 발현특성을 조사하기 위해서 PBMC ( $5 \times 10^5$  cells/mL)를 24-well 배양접시에 10% heat-treated FBS 및 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI 배지를 배양액으로 plate-bound anti-CD3 (clone OKT3, 1  $\mu$ g/mL), soluble anti-CD28 (clone 28.2, 1  $\mu$ g/mL)와 anti-CD137 (clone 4B4, 1  $\mu$ g/mL)를 처리하여 3일간 배양하였다. 또한 실험군과 대조군의 단핵세포로부터 분리한 CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 세포에서의 CD137 발현을 조사하기 위해 CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 세포( $2.5 \times 10^5$  cells/mL)를 24-well 배양접시에 하룻밤 배양한 후 anti-CD3 (1  $\mu$ g/mL, clone OKT3, eBioscience, San Diego, CA)와 anti-CD28 (1  $\mu$ g/mL, clone 28.2, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)를 처리하여 24시간 배양하였다. 각 세포를 수거하여 2% bovine serum albumin (BSA)과 0.1% Na<sub>3</sub>가 첨가된 1  $\times$  PBS (washing buffer)를 이용하여 2번 세척한 다음 FITC labelled anti CD137 mAb (BD Biosciences), PE-labelled CD4 mAb (BD Biosciences) 및 Cy-labelled CD25 mAb (BD Biosciences)로 4°C에서 30분간 염색하였다. 이를 washing buffer로 2번 세척한 다음, 특정 표지들의 발현을 유세포 분석기(BD FACS Calibur, BD Biosciences)의 SSC/FSC gate의 림프구 집단에서 관찰하였으며 결과를 CellQuest software (BD Biosciences)로 분석하였다.

### 4. 세포증식 정도 측정

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식 또는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 억제능을 조사하기 위해 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포( $2 \times 10^4$  cells/mL) 또는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포( $2 \times 10^4$  cells/mL)를 96-well culture plate에 각각 단독으로 배양하거나 함께 배양하였다. 이때 APC ( $2 \times 10^4$  cells/mL)와 plate-bound OKT3 (1  $\mu$ g/mL), soluble anti-CD28 (1  $\mu$ g/mL) 및 IL-2 (20 U/mL, Hemagen, Worcester, MA)를 넣어 세포를 자극하였으며 anti-CD137 mAb (4B4, 1  $\mu$ g/mL, Immunomics, Ulsan, Korea)를 처리하거나 처리하지 않고 3일 동안 배양한 후 1  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]thymidine (DuPont-NEN, MA)를 넣어 18시간 반응시켰다. 세포를 수거한 후 세포증식정도를 Trilux 1450 microbeta liquid scintillation 및 luminescence counter (Wallac Turku, Perkin Elmer)를 이용하여 측정하였다.

### 5. Real-time PCR and RT-PCR

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포로부터 Trizole을 이용하여 총 RNA를 분리한 후 Superscript II reverse transcriptase (Promega, Madison, WA)와 oligo-dT (Promega, Madison, WA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. RT-PCR은 95°C, 30초; 60°C,

30초; 70°C, 1분 조건으로 35회 시행하였고 정량적인 변화 측정을 위해 real-time PCR (MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad)을 시행하여 Foxp 3의 발현량을 MyiQ™ SYBR Green (Bio-Rad)로 측정하였고  $\beta$ -actin으로 normalized value를 측정하였다. Real-time PCR은 95°C에서 5분간 denaturation시키고 95°C, 15초; 60°C, 20초; 70°C, 30초 조건으로 40회 시행하였다. PCR을 위해 Foxp 3 primer는 5'-CAA GTT CCA CAA CAT GCG AC-3'과 5'-ATT GAG TGT CCG CTG CTT CT-3', GAPDH primer는 5'-GAT GAG ATT GGC ATG GCT TT-3'과 5'-CAC CTT CAC CGT TCC AGT TT-3'를 사용하였다.

### 6. 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 실험하였으며, 실험결과는 평균  $\pm$  평균표준오차로 나타내었으며, 대조군과 실험군의 차이에 대한 통계적 유의성은 GraphPad Prism program (GraphPad software, San Diego, CA)의 Student's t-test로 검정하였다. 통계적 유의수준은 P값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

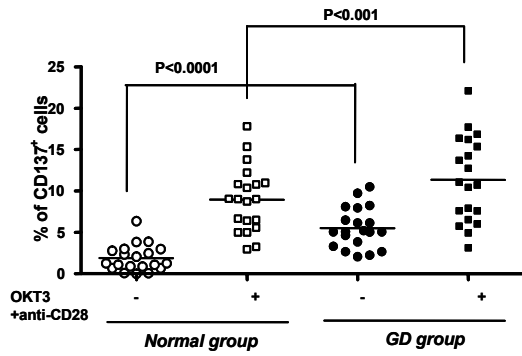
## 결 과

### 1. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에서의 CD137의 발현 특성

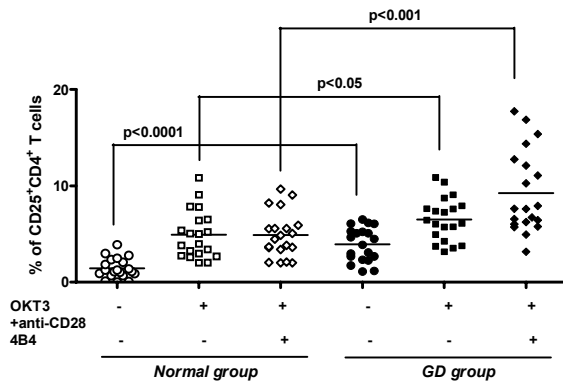
그레이브스병 환자군의 말초혈액 단핵세포로부터 분리한 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에서의 CD137의 발현특성을 조사하기 위해 유세포 분석을 실시하였다(Fig. 1). 정상인 대조군의 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에서의 CD137 발현은 비활성상태에서는  $1.89 \pm 1.60\%$ 로 낮았으나, OKT3와 anti-CD28 자극에 의한 활성화 상태에서는  $8.97 \pm 3.94\%$ 로 증가하였다. 환자군의 경우는 비활성 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에서도  $5.52 \pm 2.43\%$ 로 정상군에 비해 다소 높게 CD137가 발현되었으며( $P < 0.0001$ ), OKT3와 anti-CD28 자극으로 활성화되면  $11.37 \pm 5.13\%$ 로 더욱 증가하는 것으로 나타났다( $P < 0.001$ ). 즉, 그레이브스 환자의 경우 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에서의 CD137의 발현은 비활성 상태에서도 발현되었으며, 활성화 후 대조군에 비해 더욱 증가되는 것으로 나타났다.

### 2. CD137 자극에 의한 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식

그레이브스병 환자군의 말초혈액 단핵세포에서의 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포집단의 분포를 정상 대조군과 비교하기 위해 림프구 gating 내에서 유세포 분석을 실시하였다(Fig. 2). 그 결과 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포는 OKT3와 anti-CD28 자극에 의해 대조군에서는  $4.92 \pm 2.45\%$ , 환자군에서는  $6.51 \pm 2.24\%$ 로 증가하였다( $P < 0.05$ ). 한편, 4B4 자극에 대해서 대조군의 경우,  $4.91 \pm 2.36\%$ 로 OKT3와 anti-CD28 자극과 유사하게 나타난 반면, 환자군에서는  $9.26 \pm 4.27\%$ 로 증가하였다( $P < 0.001$ ).



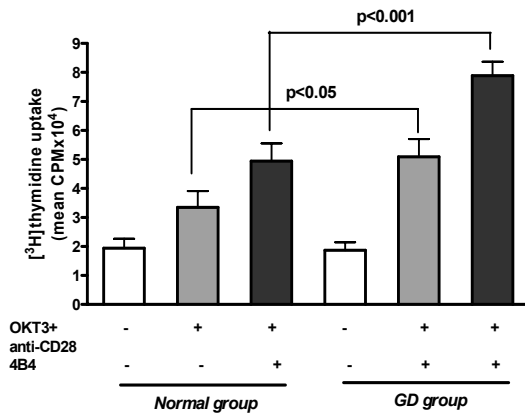
**Fig. 1.** The frequency of CD137<sup>+</sup> cells in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells of the patients with Grave's disease. The frequency of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells in PBMC of GD patients and normal subjects were analyzed by flow cytometry with PE-labelled anti-CD137 staining. The values are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate data.  $P < 0.0001$  vs. normal group.



**Fig. 2.** The CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell population in PBMC of patients with Graves' disease. PBMC were stimulated by plate-bound OKT3 (1  $\mu$ g/mL), soluble anti-CD28 (1  $\mu$ g/mL) and/or anti-CD137 (1  $\mu$ g/mL) for 24 h. The cells in these analyses were gated on lymphocytes via forward and side scatter properties in flow cytometry. The values are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate data.  $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$  and  $P < 0.0001$  vs. normal group.

즉, 그레이브스 환자의 경우 CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 세포집단이 정상군에 비해 4B4 자극에 의해 더욱 증가되는 것을 알 수 있었다.

CD137 자극에 의한 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식 정도를 proliferation assay를 통해 조사한 결과, 대조군에서는 비활성 세포에서  $1.94 \pm 1.08 (\times 10^4 \text{ cells})$ 로 낮은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포 분포가 측정되었으며, OKT3/anti-CD28에 의해 활성화 세포에서는  $3.34 \pm 1.87 (\times 10^4 \text{ cells})$ 로 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 분포가 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 또한 OKT3/anti-CD28와 4B4를 함께 처리하였을 경우에는  $4.94 \pm 2.04 (\times 10^4 \text{ cells})$ 로 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포 분포가 다소 증가하였다. 반면 환자군의 경우에는 비활성 세포에서는 대조군과 유사하게  $1.87 \pm 0.89 (\times 10^4 \text{ cells})$ 로 비교적 낮은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>



**Fig. 3.** Proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells by anti-CD137 stimulation. The CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells ( $5 \times 10^4$  cells) were stimulated with APC ( $2 \times 10^4$  cells/mL), plate-bound anti-CD3 (1  $\mu$ g/mL), soluble anti-CD28 (1  $\mu$ g/mL) and IL-2 (20 U/mL) at presence or absence with anti-CD137 mAb (4B4; 1  $\mu$ g/mL). Proliferation was determined at day 3, with [<sup>3</sup>H]thymidine added for the last 18h of culture. The values are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate data (SD = bar).  $P < 0.05$  and  $P < 0.001$  vs. normal group.

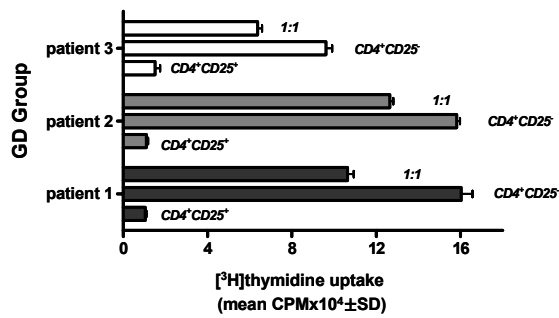
T 세포 분포를 나타내었으나, OKT3/anti-CD28 자극에 의해  $5.09 \pm 2.03 (\times 10^4 \text{ cells})$ 로 증가하였고( $P < 0.05$ ), 4B4를 함께 처리하였을 경우에 대조군에 비해  $7.89 \pm 1.58 (\times 10^4 \text{ cells})$ 로 더욱 증가하는 것으로 나타났다( $P < 0.01$ ).

### 3. CD137 자극에 의한 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 기능변화

CD137 자극에 의한 그레이브스병 환자의 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 기능변화를 조사하기 위해 4B4를 처리하여 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포 증식에 의한 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포 억제효과를 suppression assay를 통해 조사하였다. 세 명의 그레이브스병 환자에서 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식은  $1.04 \pm 0.08 (\times 10^4 \text{ cells})$ ,  $1.09 \pm 0.15 (\times 10^4 \text{ cells})$ ,  $1.51 \pm 0.40 (\times 10^4 \text{ cells})$ 로 측정되었다. 또 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 단독 증식은 각각  $16.03 \pm 0.93 (\times 10^4 \text{ cells})$ ,  $15.82 \pm 0.26 (\times 10^4 \text{ cells})$ ,  $9.62 \pm 0.51 (\times 10^4 \text{ cells})$ 로 측정된 반면에, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포와 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포를 1:1로 함께 배양할 경우  $10.64 \pm 0.51 (\times 10^4 \text{ cells})$ ,  $12.64 \pm 0.29 (\times 10^4 \text{ cells})$ ,  $6.37 \pm 0.37 (\times 10^4 \text{ cells})$ 로 측정되었다. 그레이브스 환자에서 CD137의 자극으로 인해 유도된 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에 의해 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식이 각각 33.6%, 20.1%, 34.4%로 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 4).

### 4. CD137 자극에 의한 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에서 Foxp 3 유전자 발현

그레이브스병 환자의 말초혈액으로부터 분리된 CD4<sup>+</sup>



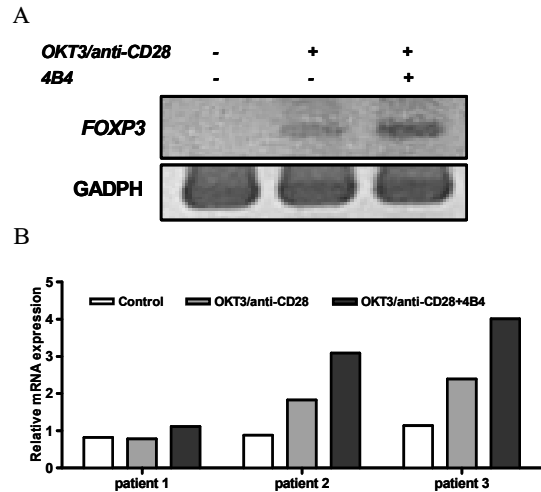
**Fig. 4.** The ability of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells to suppress the proliferation of the cocultured CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells ( $2 \times 10^4$  cells) were stimulated alone and in coculture with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells ( $2 \times 10^4$  cells) in the presence of APC ( $2 \times 10^4$  cells). The CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells were also stimulated alone. Cells were stimulated with plate-bound anti-CD3(1  $\mu$ g/mL) and soluble anti-CD28 (1  $\mu$ g/mL) at presence or absence with anti-CD137 mAb (4B4; 1  $\mu$ g/mL). Proliferation was determined at day 3, with [<sup>3</sup>H]thymidine added for the last 18h of culture.

CD25<sup>+</sup> T 세포에서의 CD137 자극에 의한 Foxp 3 유전자 발현변화를 알아보기 위해서 reverse transcription-PCR을 수행하였다. 비활성 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에서의 Foxp 3 유전자의 발현은 관찰되지 않았으며, OKT3/anti-CD28 처리 시 다소 증가되었고 4B4 처리 후 현저히 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 5A).

또한 그레이브스병 환자의 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에서의 Foxp 3 유전자의 상대적 양적발현을 real-time PCR로 측정 한 결과, 환자 1에서 무처리 시 0.82배였고, OKT3/anti-CD28 처리 후 0.78배였으며, 4B4를 함께 처리 시 1.11배로 증가하였으며, 환자 2에서는 무처리 시 0.88배였고, OKT3/anti-CD28 처리 후 1.82배였으며, 4B4를 함께 처리 시 3.09배로 환자 1에 비해 증가하였고, 환자 3에서는 무처리에서 1.14배였고, OKT3/anti-CD28 처리 후 2.39배로 증가하였으며, 4B4를 함께 처리 시 4.01배로 환자 1과 2에 비해 증가하였다. 또한 환자 세 명 모두 OKT3/anti-CD28 처리에 비해 4B4를 함께 처리할 경우 Foxp 3의 발현이 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 5B).

### 고 찰

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포는 억제성 T 세포 또는 면역조절 T 세포(regulatory T cell; Treg)라고 불리는 항원 특이적으로 발생하는 면역반응을 조절하는 특정세포집단이며 사람과 쥐에서 전체 CD4<sup>+</sup> T 세포의 5~10% 정도 차지한다[12,13]. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포는 전사인자인 Foxp 3와 세포표면수용체인 CTLA-4와 당질코르티코이드 유도성 종양괴사인자 수용체를 발현하며 IL-10, 종양괴사인자- $\beta$ , IL-2와 같은 사



**Fig. 5.** Expression of Foxp 3 in CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells of GD patients. The CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were stimulated with OKT3/anti-CD28 (1  $\mu$ g/mL) alone or with 4B4(1  $\mu$ g/mL). After mRNA was isolated from cells using TRIzol reagent, cDNA was reverse transcribed and then amplified by PCR. Expression of Foxp 3 gene in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells of GD patients was determined by reverse transcription-PCR (A) and real time PCR (B).

이토카인이나 수지상세포와 같은 특정 세포표현형을 가지는 세포에 영향을 받아 다른 T 세포의 증식을 비특이적으로 억제하는 기능을 갖고 있다[13~17]. 그레이브스병은 자가항체에 의하여 유도된 세포독성에 의한 조직의 파괴로 인한 자가면역질환이며 갑상선 기능항진증의 대표적인 질환에 속한다. 그레이브스병 동물실험에 의하면 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포가 그레이브스병에서 감수성 및 중증도에 중요한 작용하며 effector T 세포와 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포 사이의 균형이 병태생리에 관여한다고 보고되었다[18]. 또한 조절 T 세포의 소실은 쥐와 사람에서 자가면역질환에 대한 감수성을 증대시키는 데 최근 보고에 따르면 그레이브스병 안구병증의 발병 요인이 되며[19], 조절 T 세포에서의 CTLA4 유전자발현이 그레이브스병 및 하시모토씨병 등의 갑상선 자가면역질환 발생과 밀접하게 연관된다고 하여[20], CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포가 갑상선 자가면역질환 유발에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포가 어떻게 유도되는지 그 기전에 대해서는 아직 명확하게 밝혀지지 않았으며 종양괴사인자- $\beta$ , IL-10, CTLA-4 등의 사이토카인이 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다[21]. 또한 CD137에 대한 항진성 단클론항체의 투여가 CD137-매개의 신호전달을 조절함으로써 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포 매개의 실험성 자가면역성 갑상선염 관용이 유도될 수 있다고 하였다[7~9].

본 연구에서는 그레이브스병 환자의 말초혈액 단핵세포에서 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 분포를 정상인 대조구와 비교하고 말초혈액 단핵세포로부터 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포를 분리하

여 T 세포의 대표적인 공동자극분자인 CD137 자극을 이용하여 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식을 유도할 수 있는지에 대해 조사하였다. 그 결과 그레이브스병 환자에서 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포 분포는 정상인에 비해 유사하거나 낮았지만 OKT3 자극에 의해 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포가 늘어났다(Fig. 1). 또한 OKT3/anti-CD28 자극 후 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에서의 CD137 발현이 증가하였으며, 4B4 처리에 의한 CD137 자극을 통해 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식이 더욱 유도되었다. 나아가 증식된 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식을 억제시키는 것으로 나타났다. 이는 CD137 매개의 공동자극이 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식을 유도함으로써 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포를 통한 자가반응성 T 세포 증식이 억제되어질 수 있음을 시사한다. 그러나 Morris 등은 CD137 단클론 항체의 투여와 달리 당질코르티코이드 유도성 중앙괴사인자 수용체 단클론 항체 투여 시 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포 매개의 보호효과를 차단함으로써 실험성 자가면역성 갑상선염 관용을 억제시킨다고 보고하였는데[22], 이런 차이점은 아마도 항체에 의한 신호전달과 연관되며 자극신호를 운반하는 사이토카인이나 단클론 항체의 상대적인 효능 차이라고 생각된다. 본 연구에서 그레이브스병 환자에서의 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에서의 당질코르티코이드 유도성 중앙괴사인자 수용체이나 CTLA-4에 대한 발현특성 및 CD137 자극에 의한 변화를 조사하지 못했으며 차후 실험되어야 할 것으로 사료된다. 또한 본 실험에서는 제한된 혈액(5~10 mL)으로부터 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포를 분리하는데 기술적인 어려움이 있어 기능변화 조사를 위한 충분한 수의 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포를 확보하지 못한 환자들의 경우 동일한 실험을 수행하지 못했다. 이는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 분리방법으로 사용된 magnetic bead system 대신 유세포 분석기의 cell sorter system을 직접 활용함으로써 보완될 수 있을 것으로 생각된다.

Foxp 3는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에서만 발견되는 핵심조절인자로서 IL-2를 투여하게 되면 CD25와 Foxp 3 발현이 증가하고 다른 전사인자 단백질인 nuclear factor of activated T cell (NFAT)과 협력해 조절 T 세포를 제어하는 것으로 알려져 있다[23]. 또한 Foxp 3는 다른 T 세포에서의 사이토카인 생성을 억제함으로써 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에 의한 effector T 세포 조절기능을 담당하고 있다. 본 연구에서는 그레이브스병 환자의 말초혈액 내 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 기능 및 CD137 자극에 의한 질적인 변화를 확인하기 위해서 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 전사인자인 Foxp 3의 유전자 발현을 real-time PCR로 조사하였다. 그 결과 그레이브스병 환자의 말초혈액 내 존재하는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에서는 Foxp 3의 유전자 발현이 뚜렷이 확인되었으며, 이들 Foxp 3의 유전자 발현은 CD137 자극에 의해 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서 CD137 자극은 그레이브스병 환자의 말초혈액 내 존재하는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식을 유도할 수 있을 뿐 아니라

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 Foxp 3의 유전자 발현을 증가시킴으로써 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 고전적인 기능인 다른 T 세포의 비특이적인 억제기능에도 기여하는 것으로 생각된다. 비록 적은 혈액으로부터 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포를 분리함으로써 Foxp 3의 발현을 여러 환자에서 충분히 조사할 수 없었으나, 본 실험에서 3명의 그레이브스병 환자들에서 Foxp 3의 유전자 발현을 명확히 관찰하였으며, 정상인과 유사하거나 낮은 조절 T 세포를 갖고 있음이 밝혀졌다. 또한 이들 환자에서는 정상인과 다르게 CD137-매개의 공동자극에 의한 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식이 관찰되었으며, 특히 핵심전사인자인 Foxp 3의 발현 증가가 확인되었다.

본 연구는 CD137 공동자극에 의한 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식 유도 효과를 그레이브스병 환자에서 관찰한 연구로서, 동물에서가 아닌 사람에서의 결과이므로 차후 그레이브스병을 포함한 다양한 자가면역질환에서의 조절 T 세포의 연구 및 조절 T 세포에 의한 활성화 T 세포 조절에 대한 연구에도 도움이 될 것으로 생각된다.

## 요 약

**연구배경:** 면역조절 T 세포(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포)는 면역 관용에 매우 중요한 역할을 하며 이들 세포의 기능에 이상이 생기면 자가면역질환이 생기게 된다. CD137 (4-1BB)은 활성화된 면역세포에서 발현되어 면역반응을 조절하는 대표적인 공동자극분자이다. 본 연구에서는 그레이브스병 환자의 말초혈액으로부터 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포를 분리하여 CD137의 발현특성을 조사하고, CD137 매개의 공동자극을 통한 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포 증식 유도가 병원성 자가항원 반응성 CD4<sup>+</sup> T 세포의 기능을 억제할 수 있는지를 알아보고자 하였다.

**방법:** 그레이브스병 환자의 말초혈액에서 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 분포 및 CD137의 발현특성은 유세포 분석하였으며, CD137 자극에 의한 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식 및 활성화는 유세포 분석 및 proliferation assay를 통해 조사하였다. 또한 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포에서의 FoxP3 유전자의 발현양상을 real-time PCR로 조사하였다.

**결과:** 그레이브스병 환자의 단핵세포에서 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell의 발현은 낮은 것으로 나타났다. 그러나 4B4 처리에 의한 CD137 매개의 공동 자극은 그레이브스병 환자의 말초혈액 내 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell의 증식을 유도하였으며, Foxp 3의 발현을 증가시켰다. 또한 CD137 공동자극에 의해 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포들의 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식억제 능력이 증가하였다.

**결론:** 그레이브스병 환자에서 CD137 매개의 공동자극은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포의 증식을 유도함으로써 병원성 자가반응성 T 세포의 증식이 억제되어질 수 있는 것으로 시사되며, 이를 통한 효과적인 면역억제기능에 기여할 수 있을 것으로

생각된다.

### 참 고 문 헌

1. Mathis D, Benoist C: Back to central tolerance. *Immunity* 20:509-516, 2004
2. Heufelder AE: Pathogenesis of ophthalmopathy in autoimmune thyroid disease. *Rev Endocr Metab Disord* 1:87-95, 2000
3. Weetman AP: Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *Eur J Endocrinol* 148:1-9, 2003
4. Salmaso C, Olive D, Pesce G, Bagnasco M: Costimulatory molecules and autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity* 35:159-167, 2002
5. Croft M: Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:265-273, 2003
6. Kim ES, Jung HW, Nam-Goong IS, Woo SJ, Choi JI, Kim YI: Expression of 4-1BB and 4-1BBL in Graves' disease. *J Kor Soc Endocrinol* 21:116-124, 2006
7. Mittler RS, Foell J, McCausland M, Strahotin S, Niu L, Bapat L, Hewes LB: Anti CD137 antibodies in the treatment of autoimmune disease and cancer. *Immunol Res* 29:197-208, 2004
8. Foell J, Strahotin S, O'Neil SP, McCausland MM, Suwyn C, Haber M, Chander PN, Bapat AS, Yan XJ, Chiorazzi M, Hoffmann MK, Mittler RS: CD137 costimulatory T cell receptor engagement reverses acute disease in lupus prone NZB x NZW F1 mice. *J Clin Invest* 111:1505-1518, 2003
9. Sun Y, Lin X, Chen HM, Wu Q, Subudhi SK, Chen L, Fu XY: Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 168:1457, 1465, 2002
10. Seo SK, Choi JH, Kim YH, Kang WJ, Park HY, Suh JH, Choi BK, Vinay DS, Kwon BS: 4-1BB mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 10:1088-1094, 2004
11. Roncarolo M and Levings MK: The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 12:676-83, 2000
12. Shevach EM: Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 18:423-449, 2000
13. Zwar TD, VAN Driel IR, Gleeson PA: Guarding the immune system: Suppression of autoimmunity by CD4CD25 immunoregulatory T cells. *Immunol Cell Biol* 84:487-501, 2006
14. Morris GP, Kong YC: Interference with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cell-mediated tolerance to experimental autoimmune thyroiditis by glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor monoclonal antibody. *J Autoimmun* 26:24-31, 2006
15. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061, 2003
16. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY: Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336, 2003
17. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF: Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172:5149-5153, 2004
18. Saitoh O, Nagayama Y: Regulation of Graves' hyperthyroidism with naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in a mouse model. *Endocrinology* 147:2417-2422, 2006
19. Ludgate M, Baker G: Inducing Graves' ophthalmopathy. *J Endocrinol Invest* 27:211-215, 2004
20. Furugaki K, Shirasawa S, Ishikawa N, Ito K, Ito K, Kubota S, Kuma K, Tamai H, Akamizu T, Hiratani H, Tanaka M, Sasazuki T: Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with Graves' disease and autoimmune thyroid disease in the Japanese. *J Hum Genet* 49:166-168, 2004
21. Liu H, Hu B, Xu D, Liew FY: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF- $\beta$  and CTLA-4. *J Immunol* 171:5012-5017, 2003
22. Morris GP, Kong YC: Interference with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cell-mediated tolerance to experimental autoimmune thyroiditis by glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor monoclonal antibody. *J Autoimmun* 26:24-31, 2006
23. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M: Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- $\kappa$ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci* 102:5138-5143, 2005